

唇裂 ・ 口蓋裂発症におけるビタミン関連遺伝子の 関与

著者	菅野 貴世史
号	2072
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/22617

氏 名（本籍）	菅 ^{かん} 野 ^の 貴 ^き 世 ^よ 史 ^し
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 0 7 2 号
学位授与年月日	平 成 16 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	唇裂・口蓋裂発症におけるビタミン関連遺伝子の 関与

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教授 山 田 敦	教授 飯 沼 一 宇
	教授 岡 村 州 博	

論文内容要旨

唇裂・口蓋裂は、先天奇形の中で最も発症率の高い疾患の1つであり、地域、人種、社会経済的背景によりその率は異なるとされている。日本人においては1000人あたり0.85～2.68人の発症率があり、他の人種と比べて高い。唇裂・口蓋裂の発症には複数の遺伝的要因と環境因子が関与していると考えられている。候補遺伝子としてはこれまでに、*TGFA* (6p23), *RARA* (17q21), *TGF3* (14q24), *MSX1* (4p16), *MTHFR* (1q36) などが報告されている。環境要因としては、妊娠期間中の喫煙やアルコール摂取との関係が挙げられているが、ビタミン剤の摂取が唇裂・口蓋裂の発症率を下げるという報告がこれまで数多くある。本研究はビタミン代謝の関係する遺伝子を中心に、それらが唇裂・口蓋裂の発症のリスクに影響を与えているかどうかを明らかにすることを目的とした。

ビタミンA関連物質である retinoic acid (RA) は様々な細胞の分化に関与し、これはまた顔面奇形を誘発する因子としても知られている。retinoic acid receptor α (*RARA*) は、この RA 受容体であり、標的組織において遺伝子発現を調節することで、RA の細胞への働きを制御する。この遺伝子が非症候性唇裂・口蓋裂の発症に関与しているという報告が欧米においていくつかあり、そこで今回初めて日本人の非症候性の唇裂・口蓋裂の患者について、この *RARA* 遺伝子の関与の有無を検討した。まず、3つのマイクロサテライトマーカーを用い、患者及びその両親を1家系とし、合計48家系について、伝達不均衡試験 (transmission disequilibrium test, TDT) を行ったが、*RARA* 遺伝子との相関は認められなかった。次に、家族歴がある患者8人に対し、*RARA* 遺伝子のエクソン全てに対し直接塩基配列決定を行い、1人の患者でエクソン1において、塩基置換を認めたが (1661 C>T)、この塩基置換は唇裂を持つ母親からではなく、唇裂を持たない父親から伝達されたものであり、発症原因とは考えにくかった。最後に48人の患者において、*RARA* 遺伝子のプロモーター部位における変異をスクリーニングするために、denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) を行った。しかしながら新たな塩基長多型を認めたものの、発症との相関は認められなかった。

葉酸の代謝に関与する酵素の一つに5, 10-methylenetetrahydrofolatereductase (*MTHFR*) がある。*MTHFR* 遺伝子の C677T 変異は、この酵素の活性を低下させることが知られており、欧米において唇裂との相関を示唆する報告がある。この C677T 変異が日本人において発症と関連があるかどうかの検証を行った。91家系の患者およびその家族において C677T 変異の同定を行い、TDT および相関研究を行った。しかし、この C677T 変異と日本人における非症候性の唇裂・口蓋裂との相関は認められなかった。

glutamic acid decarboxylase (GAD) は、 γ -aminobutyric acid (GABA) の合成を触媒する、

ビタミン B6 (pyridoxal 5-phosphate) を補酵素とする酵素である。高等生物には *GAD 65* と *GAD 67* の 2 つの遺伝子が存在するが、*GAD 67* は、正常な胎児の発育、特に顔面の発生において重要な役割を持つとされ、*GAD 67* ノックアウトマウスは口蓋裂を示す。そこで、日本人における *GAD 67* 遺伝子の非症候性の唇裂・口蓋裂発症への関与について検討を行った。まず、患者 50 人に対し、全てのエクソンおよびプロモーター部位に対し、DHPLC を用い、変異のスクリーニングを行った。その結果、プロモーター部位に 4 つ (−677 C>G, −449 C>T, −445 C>T, −292 A>C), エクソン部位に 2 つ (−147 G>A, 111 T>C), インترون部位に 1 つ (IVS9-39 c>t) 変異が見つかった。このなかで、−677 C>G と −449 C>T はそれぞれ −147 G>A と −445 C>T と完全連鎖不平衡であった。そこで、−445 C>T, −292 A>C, −147 G>A, 111 T>C, IVS9-39 c>t の 5 つの変異を組み合わせたハプロタイプで、患者 99 人を用いた相関研究を行った。その結果、ハプロタイプの頻度分布において、患者とコントロールとの間に有意差が認められた ($P=0.0028$)。さらに、患者及びその両親 99 家系において TDT を行った。その結果、口蓋裂をもつ唇裂の患者において、−445 C, −292 C, −142 G, 111 C, IVS9-39 C のハプロタイプが有意に多く伝達していた ($P=0.0077$)。

これらのことから、ビタミン代謝に関連する遺伝子である *RARA* 遺伝子、*MTHFR* 遺伝子、*GAD 67* 遺伝子のなかで、*GAD 67* 遺伝子が、日本人の唇裂・口蓋裂の発症に関与していることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

唇裂・口蓋裂は、地域、人種、社会経済的背景によりその率は異なる。日本人においては 1000 人あたり 0.85～2.68 人の発症率があり、他の人種と比べて高い。唇裂・口蓋裂の発症には複数の遺伝的要因と環境因子が関与していると考えられている。環境要因としては、妊娠期間中の喫煙やアルコール摂取との関係が挙げられているが、ビタミン剤の摂取が唇裂・口蓋裂の発症率を下げるという報告がこれまで数多くある。本研究はビタミン代謝の関係する遺伝子を中心に、それらが唇裂・口蓋裂の発症のリスクに影響を与えているかどうかを明らかにすることを目的とした。

ビタミン A 関連物質である retinoic acid (RA) は顔面奇形を誘発する因子としても知られている。retinoic acid receptor α (RARA) は、この RA 受容体であり、標的組織において遺伝子発現を調節することで、RA の細胞への働きを制御する。そこで今回初めて日本人の非症候性の唇裂・口蓋裂の患者について、この RARA 遺伝子の関与の有無を検討した。まず、3 つのマイクロサテライトマーカーを用い、患者及びその両親を 1 家系とし、合計 48 家系について、伝達不均衡試験 (transmission disequilibrium test, TDT) を行ったが、RARA 遺伝子との相関は認められなかった。次に、家族歴がある患者 8 人に対し、RARA 遺伝子のエクソン全てに対し直接塩基配列決定を行ったが、発症原因とは考えにくかった。最後に 48 人の患者において、RARA 遺伝子のプロモーター部位における変異をスクリーニングするために、denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) を行った。発症との相関は認められなかった。

葉酸の代謝に関与する酵素の一つに 5,10-methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) がある。MTHFR 遺伝子の C677T 変異は、この酵素の活性を低下させることが知られており、欧米において唇裂との相関を示唆する報告がある。91 家系の患者およびその家族において C677T 変異の同定を行い、TDT および相関研究を行った。しかし、この C677T 変異と日本人における非症候性の唇裂・口蓋裂との相関は認められなかった。

glutamic acid decarboxylase (GAD) は、 γ -aminobutyric acid (GABA) の合成を触媒する酵素である。GAD 67 は、特に顔面の発生において重要な役割を持つとされる。まず、患者 50 人に対し、全てのエクソンおよびプロモーター部位に対し、DHPLC を用い、変異のスクリーニングを行った。その結果、プロモーター部位に 4 つ (−677 C>G, −449 C>T, −445 C>T, −292 A>C)、エクソン部位に 2 つ (−147 G>A, 111 T>C)、イントロン部位に 1 つ (IVS9-39 c>t) 変異が見つかった。このなかで、−677 C>G と −449 C>T はそれぞれ −147 G>A と −445 C>T と完全連鎖不平衡であった。そこで、−445 C>T, −292 A>C, −147 G>A, 111 T>C, IVS9-39 c>t の 5 つの変異を組み合わせたハプロタイプで、患者 99 人を用いた相関研究を行った。その結果、ハプロタイプの頻度分布において、患者とコントロールとの間に有意差が認められた ($P=0.0028$)。さらに、患者及びその両親 99 家系において TDT を行った。その結果、口蓋裂をもつ唇裂の患者において、−445 C, −292 C, −142 G, 111 C, IVS9-39 C のハプロタイプが有意に多く伝達していた ($P=0.0077$)。

これらのことから、ビタミン代謝に関連する遺伝子である RARA 遺伝子、MTHFR 遺伝子、GAD 67 遺伝子のなかで、GAD 67 遺伝子が、日本人の唇裂・口蓋裂の発症に関与していることが示唆されたものであり、本論文の内容は学位授与に十分値する。